BEST AVAILABLE COPY

PCT/JP 2004/015968

REC'D 0 9 DEC 2004

PCT

WIPO

日本国特許庁 JAPAN PATENT OFFICE

21.10.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

2003年10月22日

出 願 番 号 Application Number:

特願2003-362427

[ST. 10/C]:

[JP2003-362427]

出 顯 人
Applicant(s):

株式会社日本触媒

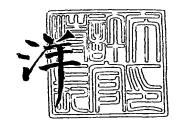
1:350

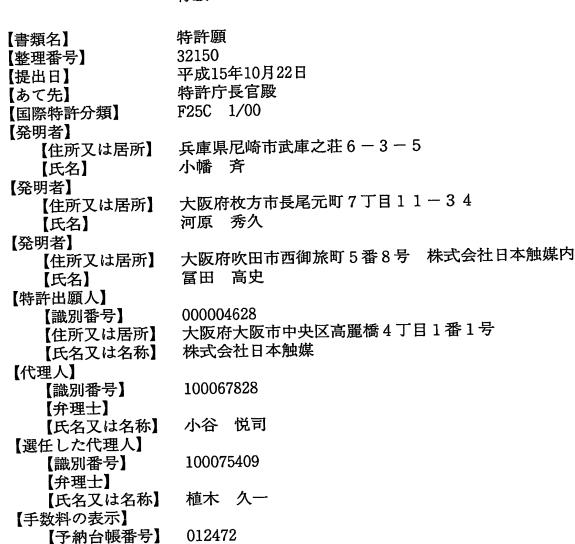
PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

特許庁長官 Commissioner, Japan Patent Office 2004年11月25日

)· [1]





21,000円

明細書 1 図面 1

要約書 1

【包括委任状番号】 9710864

特許請求の範囲 1

【納付金額】 【提出物件の目録】

> 【物件名】 【物件名】

> 【物件名】

【物件名】

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

濃度10mg/mlの水溶液が非扁平円盤型の氷晶を析出させる非タンパク質物質からなる氷結晶成長抑制剤。

【請求項2】

前記非タンパク質物質は、炭素鎖を主鎖とする高分子である請求項1に記載の氷結晶成長抑制剤。

【請求項3】

【請求項4】

冷凍食品に添加するものである請求項1又は2に記載の氷結晶成長抑制剤。

【請求項5】

濃度10mg/mlの水溶液が0.020℃以上の熱ヒステリシスを示す非タンパク質 物質からなる氷結晶成長開始温度低下剤。

【請求項6】

前記非タンパク質物質は、炭素鎖を主鎖とする高分子である請求項5に記載の氷結晶成 長開始温度低下剤。

【請求項7】

氷付着を防止するために付着箇所に散布又は塗布するものである請求項5又は6に記載 の氷結晶成長開始温度低下剤。

【請求項8】

凍結又は霜害を防止するために地面又は農作物に散布又は塗布するものである請求項5 又は6に記載の氷結晶成長開始温度低下剤。

【請求項9】

濃度10mg/mlの水溶液が、0.020℃以上の熱ヒステリシスを示し、かつ非扁平円盤型の氷晶を析出させる非タンパク質物質からなる水の凝固コントロール剤。

【請求項10】

前記非タンパク質物質は、炭素鎖を主鎖とする高分子である請求項9に記載の水の凝固 コントロール剤。

【請求項11】

氷点下での生体組織の損傷又は体液の凍結を防止するために生体組織又は体液に注入するものである請求項9又は10に記載の水の凝固コントロール剤。

【書類名】明細書

【発明の名称】氷結晶成長抑制剤、氷結晶成長開始温度低下剤、及び水の凝固コントロー

【技術分野】

[0001]

本発明は合成物質に関するものであり、より詳細には不凍タンパク質が有するような不 凍活性を示す物質に関するものである。

【背景技術】

[0002]

不凍タンパク質の不凍活性は、非特許文献1にその概略が説明されている。すなわち不 凍タンパク質(AntiーFreeze Protein;AFPと称される場合もある)は、極地に生息する魚、昆虫、植物などに含まれる特殊なタンパク質である。例えば通 常の魚類の体液は、-0.8℃前後で凍結するのに対して、AFPを体内に有する魚類の 体液は−2℃以下まで下がっても凍結しないという特徴がある。海水は−1.9℃程度で 凍ってしまうため、AFPを体内に有する魚類は体液が凍ることなく生息が可能となる。

[0003]

凝固点の降下は、一般には、凝固点降下温度が溶質のモル濃度と正比例するモル凝固点 降下則によって説明されることが多い。しかしAFPのモル濃度と凝固点降下温度とは正 比例しない。すなわちAFPは、モル凝固点降下則とは異なる作用で体液の凍結を防止し ており、生体内で成長した氷結晶の成長面に特異的に吸着し、氷結晶の成長を阻害するこ とによって体液の凍結を防止している。

[0004]

氷結晶の成長について図1、図2-a、図2-bを参照しながらより具体的に説明する と、以下の通りである。図1はAFPが存在しない場合の氷晶の成長を示す概念図であり 、図2-a及び図2-bはAFPが存在する場合の氷晶の成長の一例を示す概念図である 。図1に示すように、一般に氷の最小核が形成されると、この最小核はa軸方向及びc軸 方向の両方に成長する。ただしa軸方向の成長速度はc軸方向の成長速度より約100倍 程度速いため、円盤状の氷の核(氷晶) 1 が形成される。これに対して図 2 - a に示すよ うに、AFPが存在する場合、氷の最小核ができるとただちにa軸方向の面(プリズム面) に接着又は吸着し、a軸方向の氷の成長を抑止するため、六方晶状の氷晶2が形成され ることとなる。そしてこの六方晶状の氷晶 2 は図 2 - b に示すように、 c 軸方向に小さな 六方柱を積み重ねるようにして成長し、バイピラミッド型氷晶 3 となる。なおAFPは c 軸方向の成長を抑止する場合もあり、このときは六方晶状のまま(図2-a参照)となる 。いずれにせよAFPが存在すると、氷晶が通常(扁平円盤型)とは異なる形態となる。

[0005]

AFPが有する不凍活性は、前述したような氷晶形態の変化で特徴づけられるだけでな く、以下のような点でも特徴づけられる。すなわちc軸方向などの結晶成長が抑制されて いるため、氷晶同士の合一も抑制される。従って氷結晶の粗大化が抑制されることも不凍 活性の一つといえる。

[0006]

さらに熱ヒステリシスを示すことも不凍活性の一つである。すなわちAFPが溶解した 水溶液を過冷却して一度完全に凍結させ、系の温度を徐々に上昇させると融解する。この 融解温度(融点)よりも僅かに温度を下げて長時間放置すると、通常であるならば凍結が 始まる(すなわち融点と凝固点とは一致する)が、AFPが存在していると凍結は始まら ず、さらに温度を下げることによって初めて凍結が始まる。前記融解温度(融点)と、再 度の凍結温度(凝固点)との差は熱ヒステリシスと称されており、この熱ヒステリシスが あることも不凍活性の認定要件の一つをなす。

[0007]

すなわち不凍活性とは、1)氷晶形態が変化する(非扁平円盤形となる)こと、2)氷 晶の合一が抑制されること、3)熱ヒステリシスがあることを意味する。なお1)氷晶形 態が変化すること、及び2)氷晶の合一が抑制されることは、いずれも氷晶の成長が抑制 されることが原因となっており同一視することができるため、本明細書では1) 氷晶形態 が変化し(非扁平円盤形となり)、2)熱ヒステリシスがあれば、不凍活性があるとする

[0008]

このような不凍活性を有するAFPは、種々の応用開発が研究されている。例えば冷凍 食品の品質やきめ(テクスチャー)改善用途(特許文献1~14など)、生体組織及び体 液の耐凍性改善用途(特許文献15~17など)、氷蓄熱システム用途(特許文献18な ど) などの開発が活発である。

【非特許文献1】西村紳一郎, 「不凍糖タンパク質の合成-不凍魚の秘密をさぐる-」,現代化学,東京化学同人,1999年4月,第337号,第56-62頁

【特許文献1】国際公開第96/39878号パンフレット

【特許文献2】国際公開第96/11586号パンフレット

【特許文献3】国際公開第98/4699号パンフレット

【特許文献4】国際公開第98/4147号パンフレット

【特許文献5】国際公開第98/4148号パンフレット

【特許文献6】特開2000-157195号公報

【特許文献7】国際公開第99/37164号パンフレット

【特許文献8】国際公開第99/37673号パンフレット

【特許文献9】国際公開第00/53025号パンフレット

【特許文献10】国際公開第00/53026号パンフレット

【特許文献11】国際公開第00/53027号パンフレット

【特許文献12】国際公開第00/53028号パンフレット

【特許文献13】国際公開第00/53029号パンフレット

【特許文献14】国際公開第99/37673号パンフレット

【特許文献15】国際公開第91/10361号パンフレット

【特許文献16】国際公開第97/36547号パンフレット

【特許文献17】国際公開第00/00512号パンフレット

【特許文献18】特開平8-75328号明細書 【特許文献19】特許第3111219号明細書

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

[0009]

しかし、不凍タンパク質は極めて高価であり、今のところ100万円/gもする。さら には熱によって変性しやすく、また生体に適用する場合には抗原抗体反応を引き起こす虞 もある。非タンパク質系の不凍活性を有する物質については、今のところ見つかっていな V1º

[0010]

なお特許文献19にはポリビニルアルコールを利用した冷熱輸送方法が開示されており 、実施例の欄にはポリビニルアルコールを用いると粒状氷結晶が再結晶しないことが示さ れている。しかし不凍活性の重要な要件である熱ヒステリシスに関してどのような挙動を 示すかについては、全く示されていない。

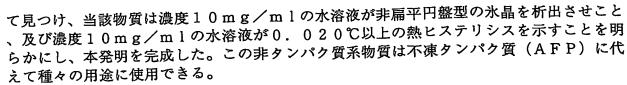
[0011]

本発明は上記の様な事情に着目してなされたものであって、その目的は、不凍タンパク 質の不凍活性を利用した種々の用途開発を、不凍タンパク質を使用することなく達成する 点にある。

【課題を解決するための手段】

[0012]

本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、タンパク質系以外に も不凍活性を有する物質(例えばアクリルアミドのホモポリマー)が存在することを初め



[0013]

すなわち本発明に係る氷結晶成長抑制剤は、濃度10mg/mlの水溶液が非扁平円盤 型の氷晶を析出させる非タンパク質物質からなる。この氷結晶成長抑制剤は、氷蓄熱シス テムの熱媒体に添加することができ、また冷凍食品に添加することができる。

[0014]

また本発明に係る氷結晶成長開始温度低下剤は、濃度10mg/mlの水溶液が0.0 20℃以上の熱ヒステリシスを示す非タンパク質物質からなる。この氷結晶成長開始温度 低下剤は、氷付着を防止するために付着箇所に散布又は塗布することができる。また凍結 又は霜害を防止するために地面又は農作物に散布又は塗布することができる。

本発明に係る水の凝固コントロール剤は、濃度10mg/mlの水溶液が、0.020 ℃以上の熱ヒステリシスを示し、かつ非扁平円盤型の氷晶を析出させる非タンパク質物質 からなる。この水の凝固コントロール剤は、氷点下での生体組織の損傷又は体液の凍結を 防止するために生体組織又は体液に注入することができる。

[0016]

上記非タンパク質は、例えば、炭素鎖を主鎖とする高分子である。

【発明の効果】

[0017]

本発明の非タンパク質物質は、濃度10mg/mlの水溶液が非扁平円盤型の氷晶を析 出させ、また0.020℃以上の熱ヒステリシスを示すため、不凍タンパク質を使用しな くても、不凍活性を利用した種々の用途に利用できる。

【発明を実施するための最良の形態】

[0018]

本発明は、不凍活性を示す非タンパク質系物質に係るものである。当該物質は、濃度 1 0 m g/m l の水溶液としたとき、氷晶形態が変化し(非扁平円盤形となり)、かつ熱ヒ ステリシスを示す。

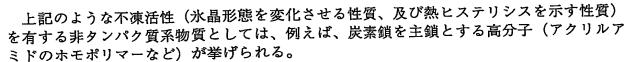
[0019]

前記氷晶形態の変化とは、より詳細に説明すると、本発明の非タンパク質系物質を濃度 10mg/mlの水溶液として冷却していったとき、図1に示すような扁平円盤状の氷晶 1とはならないことを意味する。例えば、図2-aに示すような六方晶状(扁平六角柱状) の氷晶 2 や、図 2 ー b に示すようなバイピラミッド形の氷晶 3 となる。このように氷晶 形態が変化するのは、所定方向[例えば、a軸方向(プリズム面と直交する方向)、又は 前記 a 軸方向と c 軸方向 (基底面と直交する方向) の両方向] の結晶の成長が抑制されて いるためである。

[0020]

また前記熱ヒステリシスは、以下のように定義される温度である。すなわち対象物質を 濃度10mg/mlの水溶液とし、当該水溶液を過冷却して一度完全に凍結させ、系の温 度を徐々に上昇させて氷を溶かしていき、僅かに氷の結晶が残った段階で(例えば、視野 0. 1 mm×0. 1 mm当たり、大きさ約0. 08~0. 1 mmの結晶が1個だけ残った 段階で)再び徐々に冷却(例えば、冷却速度1℃/分程度)していき、再び氷晶を成長さ せる。前記僅かに氷の結晶が残った温度(融点)と、氷晶の再成長が観察され始める温度 (凝固点)とを測定し、これらの温度差(融点-凝固点)を求める。前記温度差(融点-凝固点)は必然的に誤差を含むが、前記温度差が0.020℃以上あるとき、誤差を考慮 しても熱ヒステリシスがあるといえる。従って本発明の非タンパク質系物質とは、前記温 度差(融点−凝固点)が0.020℃以上である物質である。

[0021]



[0022]

不凍活性を有する非タンパク質系物質は、当該不凍活性の内容に応じて種々の用途に使用できる。例えば氷晶形態を変化させる性質は、氷結晶成長抑制剤として利用できる。この場合、氷の成長を抑制することによって氷の合一化を抑制できる。前記氷結晶成長抑制剤は、例えば、氷蓄熱システムの熱媒体に添加してもよく、また冷凍食品(例えばアイスクリーム)に添加してもよい。氷蓄熱システム用途に使用すれば、熱媒体が氷を析出させる際に氷が合一化してシステムが運転不能となることを防止できる。なお氷そのものの量は実質的には変化しないため、システムの蓄熱能力が低下する虞はない。加えて比較的少量で効果があるので、多大な過冷却状態を引き起こさない。さらに本発明の非タンパク質系物質は化学的に安定なので、運転効率を保ったまま長期間の運転が可能である。また、冷凍食品に添加すれば、食品中の氷が合一化して食感が低下するのを防止できる。

[0023]

一方、本発明の非タンパク質系物質が有する、熱ヒステリシスを示す性質は、氷の成長開始温度低下剤として利用できる。氷結晶成長開始温度低下剤は、氷付着を防止するために付着箇所(例えば、飛行機などの翼や電線など)に散布又は塗布してもよく、凍結や霜害を防止するために地面(路面、土壌など)や農作物に散布又は塗布してもよい。本発明の非タンパク質系物質、特にポリアクリルアミドは、金属への腐食性が少なく、また少量添加で有効なために環境への負荷も小さいことが特徴である。

[0024]

また氷の成長を抑制する性質と、熱ヒステリシスを示す性質の両方を利用する場合、本発明の非タンパク質系物質は、水の凝固コントロール剤として利用できる。当該水の凝固コントロール剤は、例えば、氷点下での生体組織の損傷又は体液の凍結を防止するために生体組織又は体液に注入することができる。具体的には、養殖魚の耐凍性改善、精子や臓器などの冷凍保存、冷凍手術などに利用できる。本発明の物質は非タンパク質系なので、例えば臓器保存用に用いたとしても抗原抗体反応を引き起こす虞がない。

【実施例】

[0025]

以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はもとより下記実施例によって制限を受けるものではなく、前・後記の趣旨に適合し得る範囲で適当に変更を加えて実施することも勿論可能であり、それらはいずれも本発明の技術的範囲に包含される

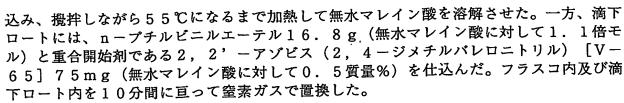
[0026]

なお以下の実験例では、下記の物質の不凍活性を調べた。

- 1) ポリアクリルアミド:アルドリッチ社製、製品番号「43494-9」(2003-
- 2004年アルドリッチ総合カタログ)、重量平均分子量(カタログ値)10,000
- 2) ポリビニルアルコール: (株) クラレ製、商品名「クラレPVA-205」 ((株) クラレ社カタログ「クラレポバール」)、鹸化度 (カタログ値) 88.0 \pm 1.5 mole %、粘度 (4%、20 \heartsuit ;カタログ値) 5.0 \pm 0.4 mPa·s
- 3) アクリロイルピロリジンのホモポリマー:数平均分子量1,200
- 4) nープチルビニルエーテルー無水マレイン酸共重合体:完全中和型 このnープチルビニルエーテルー無水マレイン酸共重合体は、以下のようにして得られたものを使用した。

[0027]

提拌装置、温度計、還流冷却管、窒素導入管および滴下ロートを備えた容量300mlのフラスコに、無水マレイン酸15g、メチルーtーブチルエーテル (MTBE) 69. 2g及び凝集防止剤としてのポリイソプチルビニルエーテル (Lutonal I-60、BASF社製、K値=60) 0.3g(生成する共重合体に対して1.0質量%)を仕出証券2004-3106819



[0028]

フラスコの内温を55℃に維持しながら、攪拌下、滴下ロートから内容物を1時間かけて滴下した。滴下終了後、温度55~60℃でさらに2時間攪拌を継続した。重合懸濁液中の共重合体濃度は30質量%であった。

[0029]

反応終了後の重合懸濁液の一部を取り出し、LC(液体クロマトグラフィー)により分析した結果、無水マレイン酸は検出されず反応は完結していることを確認した。また前記重合懸濁液をフラスコから取り出したところ、容易に取り出すことができ、また攪拌装置の攪拌羽根およびフラスコ壁への共重合体の凝集及び固着は見られなかった。得られた重合懸濁液を細孔径 1μ mの濾紙を使用して吸引濾過したところ、容易に共重合体を分離でき、濾液は透明であった。

[0030]

共重合体を温度 6 0 ℃で減圧乾燥して白色粉末 3 0. 4 gを得た。得られた共重合体の重量平均分子量は 3 1, 1 0 0 であり、平均粒子径は 7. 8 μ m であり、1 μ m 以下の粒子径を有する粒子の累積割合(ふるい下)は 0 %であった。

[0031]

このようにして得られた白色粉末を水酸化ナトリウム水溶液(カルボキシル基と当量の水酸化ナトリウム含有)に加え、室温で攪拌することにより、淡黄色均一水溶液を得た。6) イソプチルビニルエーテルー無水マレイン酸共重合体:完全中和型

nープチルビニルエーテルに代えてイソプチルビニルエーテルを用いる以外は、上記5) nープチルビニルエーテルー無水マレイン酸共重合体の場合と同様にして、重量平均分子量30,000向色粉末を得た。得られた白色粉末を、上記5) nープチルビニルエーテルー無水マレイン酸共重合体の場合と同様にして、加水分解することにより、淡黄色均一水溶液を得た。

[0032]

実験例

上記各物質の水溶液(濃度 $10\,\mathrm{mg/m1}$)を調製した。この水溶液を温度制御付き凍結ステージ(リンカム社製、 $L\,\mathrm{K}-600\,\mathrm{PM}$)にセットし、 $-30\,\mathrm{C}$ まで冷却して完全に凍結させた後、位相差顕微鏡(倍率 $100\,\mathrm{G}$)で観察しながら約 $-1\,\mathrm{C}$ まで温度を上げていき(昇温速度 $100\,\mathrm{C}$ /分)、大きさ約 $0.08\,\mathrm{c}$ 0.1 mm 程度の氷の単結晶が10だけ残る状態にした。視野を $0.1\,\mathrm{mm}$ ×0.1 mm とし(すなわち画面上に該単結晶を拡大表示させ)、この状態からゆっくりと再冷却(冷却速度 $1\,\mathrm{C}$ /分)し、氷の結晶の成長を観察した。単結晶が $10\,\mathrm{C}$ 0だけ残ったときの温度(融点)と、氷の結晶の成長が観察されたときの温度(凝固点)の差(熱ヒステリシス)を求めた。また上記操作によって成長させた氷の形態も観察した。結果を表 $1\,\mathrm{D}$ 0で図 $3\,\mathrm{C}$ 0の位相差顕微鏡写真に示す。図 $3\,\mathrm{L}$ 1 $1\,\mathrm{C}$ 1

[0033]

【表1】

	中田 35	
	昭成 「成回际 大浴液のpH (°C)	水溶液のpH
ポリアクリルアミド	0.021	5.5
ポリビニルアルコール	0.016	6.0
アクリロイルピロリジンの木モポリマー	0	4.5
nーブチルビニルエーテルー無水マレイン酸共重合体	0.0014	11.0
インブチルビニルエーテルー無水マレイン酸共重合体	0.00125	10.7

[0034]

表1及び図4~図7から明らかなように、ポリビニルアルコール、ポリビニルカプロラ クタム、アクリロイルピロリジンホモポリマー、n-ビニルエーテル-無水マレイン酸共 重合体、イソプチルビニルエーテルー無水マレイン酸共重合体は、氷晶形態を変化させる ことなく扁平円盤型の氷晶を析出させ、また熱ヒステリシスも実質的に示さなかった。

[0035]

これらに対して、表1及び図3から明らかなように、ポリアクリルアミドは、氷晶形態 を変化させてバイピラミッド型の氷晶を析出させ、しかも熱ヒステリシスを示した。

【図面の簡単な説明】

[0036]

【図1】図1は不凍活性を示さない物質の水溶液から析出する氷晶を説明するための 概念図である。

【図2-a】図2-aは不凍活性を示す物質の水溶液から析出する氷晶を説明するた めの第1の概念図である。

【図2-b】図2-bは不凍活性を示す物質の水溶液から析出する氷晶を説明するた めの第2の概念図である。

- 【図3】図3はポリアクリルアミド水溶液中の氷晶を示す顕微鏡写真である。
- 【図4】図4はポリビニルアルコール水溶液中の氷晶を示す顕微鏡写真である。
- 【図5】図5はアクリロイルピロリジンホモポリマー水溶液中の氷晶を示す顕微鏡写

真である。

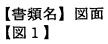
【図6】図6はn-ビニルエーテルー無水マレイン酸共重合体水溶液中の氷晶を示す 顕微鏡写真である。

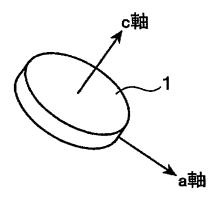
【図7】図7はイソプチルビニルエーテルー無水マレイン酸共重合体水溶液中の氷晶 を示す顕微鏡写真である。

【符号の説明】

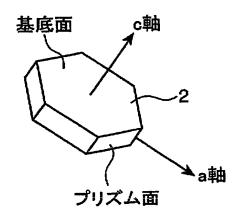
[0037]

- 1 …扁平円盤状氷晶
- 2…六方晶状氷晶
- 3…バイピラミッド型氷晶

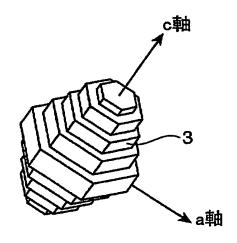


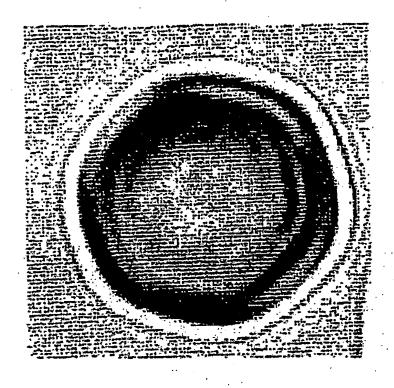


【図2-a】

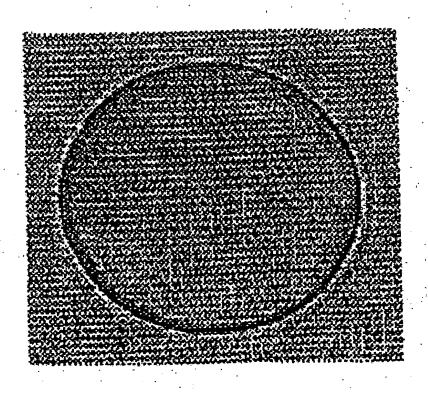


【図2-b】

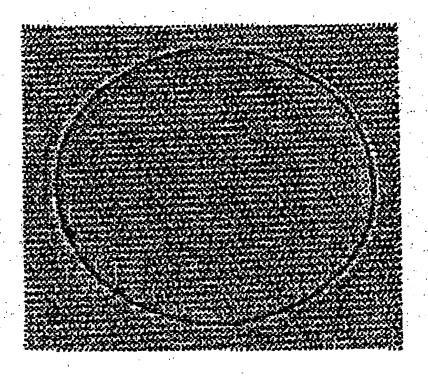




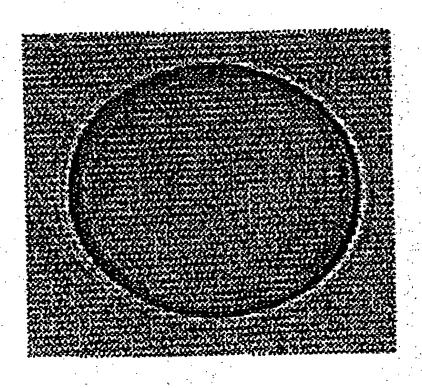
【図4】





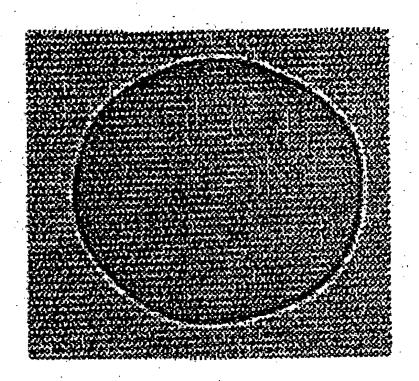


【図6】





【図7】





【書類名】要約書

【要約】

【課題】 不凍タンパク質の不凍活性を利用した種々の用途開発を、不凍タンパク質を使用することなく達成する。

【解決手段】 氷結晶成長抑制剤は、濃度10mg/m1の水溶液が非扁平円盤型の氷晶を析出させる非タンパク質物質からなる。氷結晶成長開始温度低下剤は、濃度10mg/m1の水溶液が0.020℃以上の熱ヒステリシスを示す非タンパク質物質からなる。水の凝固コントロール剤は、濃度10mg/mlの水溶液が0.020℃以上の熱ヒステリシスを示し、かつ非扁平円盤型の氷晶を析出させる非タンパク質物質からなる。これら非タンパク質物質は、通常、炭素鎖を主鎖とする高分子である。

【選択図】 図2-b



特願2003-362427

出願人履歴情報

識別番号

[000004628]

1. 変更年月日

2000年12月 6日

[変更理由]

住所変更

住 所

大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号

氏 名

株式会社日本触媒

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

□ BLACK BORDERS
□ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
□ FADED TEXT OR DRAWING
□ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
□ SKEWED/SLANTED IMAGES
□ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
□ GRAY SCALE DOCUMENTS
□ GRAY SCALE DOCUMENTS
□ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
□ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
□ OTHER:

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.